昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, August 2007, 50(8):755 - 761　　ISSN 0454-6296

桔小实蝇线粒体基因组全序列及其分析

徐　浪[1],余道坚[1,*],张润杰[2],李建光[3],康　林[1],陈志粦[1],焦　懿[1]

(1. 深圳出入境检验检疫局动植中心,广东深圳　518001;
2. 中山大学昆虫学研究所,有害生物控制与利用国家重点实验室,广州　510275;
3. 北京出入境检验检疫局,北京　100026)

摘要:桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 线粒体基因组全序列对研究实蝇分子系统进化具有重要意义。本研究通过 DNA 测序和克隆技术,对桔小实蝇 mtDNA 全序列进行了测定和分析。结果表明 桔小实蝇线粒体基因组全长 15 915 bp (GenBank 序列号:DQ845759)。基因组碱基组成为 39.3% A,16.2% C,10.2% G,34.3% T,由 13 个蛋白编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因以及一个非编码的控制区域(A + T-rich 区)组成。7 个蛋白编码基因和 13 个 tRNA 基因从 J 链编码,其余 6 个蛋白编码基因和 9 个 tRNA 基因从 N 链编码。位于 J 链上的蛋白编码基因具有近似的 A、T 含量,而位于 N 链上的蛋白编码基因的 A 的含量明显高于 T 的含量。以 mtDNA COⅠ基因为例,比较了桔小实蝇与其他 14 种实蝇的亲缘关系,结果显示其与同亚属(果实蝇亚属 *Bactrocera*)内的其他近缘种相互间的同源性很高。

关键词:双翅目;实蝇科;桔小实蝇;线粒体基因组

中图分类号:Q966　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0454-6296(2007)08-0755-07

Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)

XU Lang[1], YU Dao-Jian[1,*], ZHANG Run-Jie[2], LI Jian-Guang[3], KANG Lin[1], CHEN Zhi-Lin[1], JIAO Yi[1]

(1. Shenzhen Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Shenzhen, Guangdong 518001, China; 2. State Key Laboratory for Biocontrol & Institute of Entomology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China; 3. Beijing Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

Abstract: The complete mitochondrial genome of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* is important for general molecular and evolutionary studies in Tephritidae. Via sequencing and cloning the target DNA sequences, a complete mitochondrial genome sequence of *B. dorsalis* from the Chinese population was determined and analyzed. The results indicated that the complete mitochondrial genome of *B. dorsalis* is a circular molecule of 15 915 nucleotides (GenBank accession no.: DQ845759). Its overall composition is 39.3% A, 16.2% C, 10.2% G, and 34.3% T, and the gene content includes 22 tRNAs, 2 rRNAs and a long non-coding region (A + T-rich region). Seven protein genes and 13 tRNA genes are transcribed from J strand, and the other 6 protein genes and 9 tRNA genes are transcribed genes from N strand. Protein coding genes on J strand show a fairly similar A% and T%, whereas those encoded on N strand have a higher proportion of A than T. The similarity analysis of mtDNA COⅠ genes between *B. dorsalis* and the other 14 fruit flies showed that there was a high similarity among *B. dorsalis* and the other species belonging to the same subgenus *Bactrocera*.

Key words: Diptera; Tephritidae; *Bactrocera dorsalis*; mitochondrial genome

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel)属双翅目(Diptera)实蝇科(Tephritidae)果实蝇属 *Bactrocera* 果实蝇亚属 *Bactrocera*,是国际上重要的检疫性害虫,可危害 46 个科 250 余种果树和蔬菜(张清源,1998;梁光红等,2003;林进添等,2005;潘志萍等,2006)。该虫原产亚洲热带地区,目前分布于印度次大陆、东

基金项目:国家奥运科技项目(2004BA904B06);国家'973'项目(2002CB111405);国家自然科学基金项目(30471162)

作者简介:徐浪,女,1983 年生,硕士,主要从事昆虫分类和植物检疫研究,E-mail:janeeyre0423@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.:0755-82117990;E-mail:yudj08@gmail.com

收稿日期 Received:2006-12-27;接受日期 Accepted:2007-08-02

南亚、南太平洋地区和夏威夷群岛等(Christenson and Foote,1960),我国主要分布在南方 9 省区(湖南、广东、广西、海南、福建、四川、云南、贵州、台湾)(Drew and Hancock,1994;汪兴鉴,1996;侯伯华和张润杰,2005)。

动物 mtDNA 属母系遗传,是共价闭合的双链 DNA 分子,核酸序列和组成比较保守,基因的排列顺序比较稳定而且紧密,无重组和单拷贝。由于其结构和进化上的特点,mtDNA 已成为研究动物起源进化以及群体遗传分化的理想对象(Vigilan *et al*., 1991 张亚平和施立明,1992;施伟和叶辉,2004;朱振华等,2005)。昆虫 mtDNA 大小约为 15.4～16.3 kb,其基因组大小的变化受 A+T-rich 区长度变化的影响十分显著(Wolstenholme,1992)。A+T-rich 区的长度最短为 399 bp,最长达 4 601 bp,两者相差 4 202 bp,前者见于 *Tricholepidion gertschi*,后者见于黑尾果蝇 *Drosophila melanogaster*(Zhang and Hewitt, 1997)。昆虫线粒体基因组由 2 个 rRNA 基因(lrRNA 和 srRNA)、22 个 tRNA 基因、13 个蛋白编码基因[Cytb 基因(细胞色素 *b* 基因,cytochrome oxidase *b*),ATPase6 和 ATPase8(ATP 酶亚基基因 6 和 8,ATP synthase subunits 6 and 8),COⅠ、COⅡ和 COⅢ(细胞色素氧化酶亚基基因Ⅰ～Ⅲ,cytochrome oxidase subunit Ⅰ－Ⅲ),ND1～6 和 ND4L(NADH 降解酶基因 1～6 和 4L,NADH dehydrogenase subunit 1－6 and 4L)],共 37 个基因和 1 个包含复制启动子的非编码区(A+T-rich 区)组成(Wolstenholme and Clary,1985;Wolstenholme,1992;Beard *et al*., 1993;Spanos *et al*., 2000;Nardi *et al*., 2003;Bae *et al*., 2004)。Aloni 和 Attardi(1971)将 mtDNA 两条链中密度较小者命名为轻链(L 链),另一条命名为重链(H 链)。考虑到昆虫 mtDNA 没有明显的 L 链与 H 链之分,Simon 等(1994)根据昆虫 mtDNA 中多数基因都是从一条链上转录的特点,将这一条链定义为 J 链,另一条链定义为 N 链。

自 Wolstenholme 和 Clary(1985)第一个报道了果蝇 *Drosophila yakuba* mtDNA 全序列以来,GenBank 已收录了 80 余种昆虫 mtDNA 全序列,其中双翅目昆虫有 15 个种。在双翅目实蝇科昆虫中,地中海实蝇 *Ceratitis capitata*(Spanos *et al*., 2003,GenBank 序列号 NC_000857)和油橄榄果实蝇 *B*. *oleae*(Nardi *et al*., 2003,GenBank 序列号 NC_005333)的线粒体基因组全序列已有报道。我们利用昆虫通用引物,通过 PCR 产物直接测序和克隆,测定了桔小实蝇 mtDNA 全序列,并对其结构进行分析,结果报道如下。所得序列已在 GenBank 登录,此为 GenBank 第一次收录和公布的由中国学者测定的昆虫 mtDNA 全序列。

1 材料与方法

1.1 供试虫源和标本保存

桔小实蝇虫源来自 2005 年 7 月广东省深圳市龙眼果实上的幼虫,经实验室饲养至成虫,成虫羽化后饥饿 1～2 天,处死后用无水酒精保存标本。

1.2 基因组 DNA 提取

单头成虫用于基因组 DNA 的提取,DNA 提取和模板质量检查方法参照 Yu 等(2005)。DNA 样品置于－40℃冰箱保存、备用。

1.3 引物设计

通用引物设计参照 Simon 等(1994),同时比对已公开报道的地中海实蝇 *C*. *capitata* 和油橄榄果实蝇 *B*. *oleae* 的 mtDNA 全序列中的同源片段,引物部分位点做适当调整。通用引物不能全部测定桔小实蝇线粒体基因组全序列,部分引物需自行设计。本研究共用引物 22 对,引物序列如表 1 所示。引物分别由上海英骏生物技术有限公司和北京奥科生物技术有限公司合成。

1.4 PCR 反应体系及反应条件的优化

PCR 反应的扩增体积为 25 μL,包含 1×PCR 缓冲液,2 mmol/L Mg^{2+},0.2 mmol/L dNTP,上下游引物各 0.2 μmol/L,1 U Taq 酶(Takara),模板 DNA 20～40 ng。少数引物在进行 PCR 扩增反应时对模板 DNA 和引物的量作适当调整。

PCR 扩增条件为 94℃预变性 90 s,共运行 30 个循环。每一循环包括:95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,最后一次循环后 72℃延伸 5 min。部分引物通过改变退火温度以达到最佳扩增效果(表 1)。PCR 产物在 1.2% 琼脂凝胶上电泳检测扩增效果。

1.5 PCR 产物纯化回收

PCR 产物纯化分两种情况。一种是 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果没有杂带,用 QIAquick PCR Purification 试剂盒(德国,QIAGEN)纯化 PCR 产物;另一种是 PCR 产物电泳结果有杂带,用 Gel Extraction 试剂盒(德国,QIAGEN)纯化。

1.6 序列测定

PCR 产物经纯化以后,即可进行直接测序,测序反应均在 DNA 自动测序仪(美国,ABI 3730)上进行。

大多数引物扩增得到的 PCR 产物均用直接测序方法获得目标序列片段。所有测序重复 1～2 次以获得较为准确的序列。

引物 SR-J-14612/N2-N-246 扩增得到 12S rRNA 至 ND2 区域（包括 A + T-rich 区）采用克隆测序。将目标片段经 *Eco*RV 酶切后连接到 pGEM-5Zf（+）载体上，重组质粒载体在进行亚克隆以后，用载体上的通用引物 T7/SP6（T7：5′-TAATACGACTCACTATAC-3′，SP6：5′-ATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3′）测序。

本研究以渐进测序的方式将桔小实蝇线粒体基因组全序列分段测出，其测序策略见图 1。图中线条下方数字表示用表 1 中对应序号引物测出的 DNA 片段，单线代表直接测序片段，双线代表克隆测序片段。共利用引物 22 对，分 22 段测序。

表 1　桔小实蝇线粒体基因组全序列 PCR 扩增引物一览表

Table 1　List of PCR primers for *Bactrocera dorsalis* mtDNA complete genome

	上游引物 Forward primer	序列（5′→3′） Sequences（5′→3′）	位置[c] Position	下游引物 Reverse primer	序列（5′→3′） Sequences（5′→3′）	位置* Position	退火温度 Tm（℃）	长度* Length（bp）
1	TM-J-206[a]	GCTAATTAAGCTACTGGGTTCAT	209－231	C1-N-1560[a]	TGTTCCTACTATTCCGGCTCA	1 601－1 621	50℃	1 317
2	TY-J-1460[a]	TACAATCTATCGCCTAAACTTCAGCC	1 503－1 528	C1-N-2329[a]	ACTGTAAATATATGATGAGCTCA	2 390－2 412	50℃	918
3	C1-J-2021[b]	AGTTTTAGCAGGAGCAATTACTAT	2 128－2 151	C2-N-3389[a]	TCATAACTTCAATATCATTG	3 446－3 465	50℃	1 246
4	TL2-J-3037[a]	ATGGCAGATTAGTGCAATGG	3 076－3 095	TK-N-3785[a]	GTTTAAGAGACCAATACTTG	3 851－3 870	55℃	699
5	C2-J-3696[a]	GAAATTTGCGGGGCTAATCATAG	3 731－3 753	C3-N-5026[b]	GAGGTCATATAGCTCCCAGTTCAAT	5 134－5 158	55℃	1 330
6	A6-J-4624[b]	ATCAGCTGTTGCTATTATTCA	4 732－4 752	C3-N-5177[b]	ACTGTAAAAAATAACCCTTGTG	5 285－5 306	50℃	554
7	C3-J-4921[b]	GTAACATTAGGATAACGGTGAGGAA	5 029－5 053	TA-N-5968[b]	CATATTCTGAGCTATAAGGTAGA	6 075－6 097	50℃	974
8	N3-J-5952[a]	GAATGAAATCAAGGTATATTA	5 985－6 005	N5-N-6662[b]	GATCAAGGTTGGTCAGAA	6 591－6 608	43.5℃	617
9	TF-J-6308[b]	AATTACCCTAACATCTTCAGTG	6 400－6 421	N5-N-7641[b]	AGTACTATCTAATCGAATTGGA	7 734－7 755	50℃	1 248
10	N5-J-7497[b]	GCTCTCTTAGTTATAGCTGC	7 591－7 610	N4-N-8718[a]	GCTTATTCATCAGTTGCTCA	8 749－8 768	56℃	1 116
11	N4-J-8549[b]	ACAAAATAAACCAGAAGAAC	8 643－8 662	N4-N-9129[b]	TGAAAGAAGATTAATTCCCAC	9 223－9 243	55℃	580
12	N4-J-8944[a]	GGAGCTTCAACATGAGCTTT	8 956－8 975	CB-N-10920[a]	TCCTCAAAATGATATTTGTCCTCA	10 945－10 968	48.6℃	1 865
13	NL-J-9533[b]	GTGTACGAATTATAGAAACTAAA	9 628－9 650	N6-N-10338[b]	AAATTGTTATTAGGTTTGTTGGG	10 432－10 454	55℃	809
14	CB-J-10612[a]	CCAATTAATATTTCAGCATGATGAAA	10 612－10 637	CB-N-11328[a]	AGCAAATAAAAAATATCATTC	11 353－11 373	50℃	714
15	CB-J-10933[a]	TATGTACTACCTTGAGGACAAATATC	10 933－10 958	N1-N-11841[a]	GGTACATTAGCTCGGTTTCGTTATGAT	11 857－11 883	48.6℃	934
16	CB-J-11545[a]	ACATGAATTGGAGCACGACCAGT	11 548－11 570	N1-N-12595[a]	GTGGCTTTTTTAACTCTTTTGGAACG	12 611－12 636	52.8℃	1 083
17	N1-J-12314[a]	TAGAATTAGAAGATCAGCCAGC	12 309－12 330	LR-N-13176[b]	ACGAGAAGACCCTATAAATC	13 194－13 213	58℃	915
18	LR-J-12887[a]	CCGGTCTGAACTCAGATCATGT	12 882－12 903	LR-N-13780[b]	ACCTTGTGTATCAGGGTTTAT	13 904－13 924	58℃	1 004
19	LR-J-13417[a]	ATGTTTTTGTTAAACAGGCG	13 417－13 436	SR-N-14588[a]	AGACTAGGATTAGATACCCTATTAT	14 613－14 637	55℃	1 138
20	SR-J-14508[a]	TACAAAACAGGTTCCTCTG	14 514－14 532	SR-N-14922[a]	AAGTTTTATTTTGGCTTA	14 946－14 963	47.1℃	347
21	SR-J-14612[a]	AGGGTATCTAATCCTAGTTT	14 618－14 637	N2-N-246[b]	AGTGATTAGGGTTCCTGTTATTA	308－330	50℃	1 713
22	SR-J-14830[b]	ATCAATAATAAAATTCAAAGCC	14 930－14 951	AT-N-15779[b]	CATTTAAGTGGTGTATGTAAC	15 820－15 840	50℃	817

[a] Simon 等设计引物(1994)；[b] 自行设计引物；[c] 在桔小实蝇线粒体基因组全序列中的对应位置（本研究）；* 该对引物测得的片段长度。[a] Designed by Simon (1994)；[b] Self-designed；[c] The position corresponding to *B. dorsalis* mtDNA (this work)；* Corresponding sequencing length.

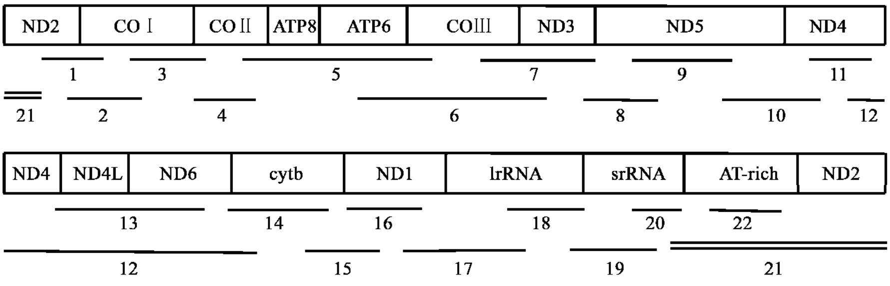

图 1　桔小实蝇 mtDNA 测序策略

Fig. 1　Sequencing strategies of *Bactrocera dorsalis* mtDNA

1.7　DNA 序列数据处理及比较

用 DNAstar 软件中的 Editseq 程序进行序列编辑，用 Seqman 程序将所测出的相邻序列进行自动拼接，成为完整的线粒体基因组全序列。因测序误差造成相同位点碱基不一致的片断，需要人工核对测序图谱和重复测序 3 次以上，以出现概率高的碱基作为该位点的碱基。将本研究获得的桔小实蝇 mtDNA 全序列与油橄榄果实蝇和地中海实蝇的 mtDNA 全序列进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 桔小实蝇 mtDNA 基因组结构

桔小实蝇线粒体基因组全长 15 915 bp，为一环形的双链 DNA（图 2）。其长度比油橄榄果实蝇（15 815 bp）长 100 bp，比地中海实蝇（15 980 bp）短 65 bp。桔小实蝇线粒体基因组全序列已录入 GenBank 数据库，序列号为 DQ845759。

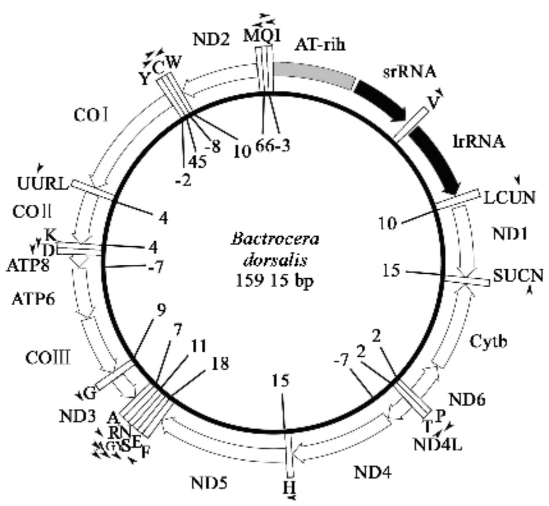

图 2 桔小实蝇线粒体 DNA 基因组遗传图谱

Fig. 2 Genetic map of the mitochondrial genome of *Bactrocera dorsalis*

图中的白色箭头、灰色箭头和箭头之间所夹竖线分别代表蛋白编码基因、rRNA 基因和 tRNA 基因。正数表示基因间的间隔数目，负数表示基因重叠的数目。White arrows, grey arrows and bars show protein coding, rRNA and tRNA genes, respectively; positive numbers indicate the distance of genes at gene junctions; negative numbers indicate the overlap of genes at gene junctions.

桔小实蝇 mtDNA 由 22 个 tRNA，2 个 rRNA，13 个蛋白编码基因以及一个包含起始复制和转录的控制区（A + T-rich 区）组成（表 2）。从 J 链编码的基因有 CO Ⅰ ~ Ⅲ、ND2、ND3、ND6、ATP6、ATP8、Cyt*b* 和 13 个 tRNA 基因（包括 tRNA-Ile、tRNA-Met、tRNA-Trp、tRNA-Leu-UUR、tRNA-Lys、tRNA-Asp、tRNA-Gly、tRNA-Ala、tRNA-Arg、tRNA-Asn、tRNA-Ser-AGN、tRNA-Glu 和 tRNA-Thr），从 N 链编码的基因有 ND1、ND4、ND4L、ND5、lrRNA、srRNA 和 9 个 tRNA 基因（包括 tRNA-Gln、tRNA-Cys、tRNA-Pro、tRNA-Tyr、tRNA-Phe、tRNA-Leu-CUN、tRNA-His 和 tRNA-Val、tRNA-Ser-UCN）。

表 2 桔小实蝇线粒体基因组分区

Table 2 Gene regions of *Bactrocera dorsalis* mitochondrial genome

基因/控制区 Gene/Control region	位置* Position	基因/控制区 Gene/Control region	位置* Position
tRNA-Ile	1 – 66	tRNA-Asn	6 166 – 6 230
tRNA-Gln	64 – 132	tRNA-Ser-AGN	6 231 – 6 298
tRNA-Met	199 – 267	tRNA-Glu	6 299 – 6 365
ND2	268 – 1 290	tRNA-Phe	6 384 – 6 448
tRNA-Trp	1 301 – 1 369	ND5	6 449 – 8 168
tRNA-Cys	1 362 – 1 424	tRNA-His	8 184 – 8 249
tRNA-Tyr	1 470 – 1 536	ND4	8 250 – 9 590
COI	1 535 – 3 069	ND4L	9 584 – 9 880
tRNA-Leu-UUR	3 070 – 3 135	tRNA-Thr	9 883 – 9 947
COII	3 140 – 3 829	tRNA-Pro	9 948 – 10 013
tRNA-Lys	3 834 – 3 904	ND6	10 016 – 10 539
tRNA-Asp	3 905 – 3 971	Cytb	10 540 – 11 674
ATP8	3 972 – 4 133	tRNA-Ser-UCN	11 675 – 11 741
ATP6	4 127 – 4 803	ND1	11757 – 12 696
COIII	4 804 – 5 592	tRNA-Leu-CUN	12 707 – 12 771
tRNA-Gly	5 602 – 5 666	lrRNA	12 772 – 14 104
ND3	5 667 – 6 018	tRNA-Val	14 105 – 14 176
tRNA-Ala	6 019 – 6 083	srRNA	14 177 – 14 966
tRNA-Arg	6 091 – 6 154	A + T-rich 区	14 967 – 15 915

* 在 *B. dorsalis* 线粒体基因组全序列上的对应位置（本研究）。* The position corresponding to *B. dorsalis* mtDNA (this work).

昆虫 mtDNA 中，tRNA-Ser（UCN）基因大多位于 J 链。但在桔小实蝇 mtDNA 中，该基因发生倒位，转移到 N 链上。这一现象与油橄榄果实蝇相似，而地中海实蝇中无类似现象。

2.2 桔小实蝇 mtDNA 基因组核苷酸组成

在桔小实蝇线粒体基因组全序列中，各碱基的总含量分别是 39.3% A，16.2% C，10.2% G，34.3% T，AT 总含量高达 73.6%，表现出昆虫线粒体基因组中著名的"A + T 偏好性"（Crozier and Crozier, 1993; Simon *et al.*, 1994）。其中，13 个蛋白编码基因的 AT 总含量为 71.2%，rRNA 中为 77.8%，A + T-rich 区更是高达 88.1%。

图 3 所示为桔小实蝇线粒体基因组除 tRNA 外

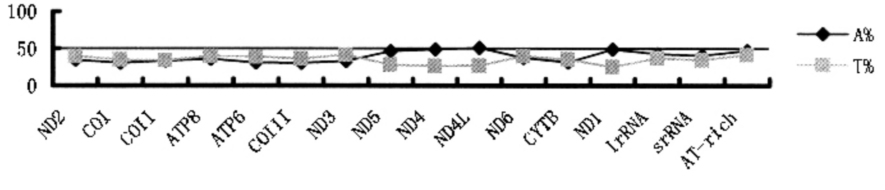

图 3 桔小实蝇线粒体基因组蛋白编码基因 AT 含量示意图

Fig. 3 Graphical representation of the percentage in A and T of protein coding genes of *Bactrocera dorsalis* mtDNA

的其他 16 个区域 AT 含量示意图。由图可以看出，J 链中的蛋白编码基因具有近似的 AT 含量，其平均值为分别为 32.9%和 37.6%，而 N 链中的蛋白编码基因的 A 的含量明显高于 T 的含量，两者数值分别是 48.4%和 26.5%。

2.3　桔小实蝇线粒体基因组 tRNA 结构分析

在桔小实蝇 mtDNA 的 22 个 tRNA 中，除亮氨酸(Leu)和丝氨酸(Ser)所对应的 tRNA 有 2 个以外，其他的氨基酸都只有一个 tRNA 与之对应。21 个 tRNA 均有规则的三叶草结构，仅 tRNA-Ser(AGN)无 D 臂，由 8 个核苷酸取代了该位置，这是节肢动物线粒体基因组的一个普遍特征(Nardi *et al*., 2003)。

2.4　桔小实蝇 mtDNA 全序列在分子系统进化研究中的应用

由于 GenBank 中收录的桔小实蝇近缘种线粒体基因序列以 COⅠ基因序列最多，因此本研究对桔小实蝇及其近缘种 COⅠ基因的相似度进行比较(表 3)。在进行比较的 15 个种中，包括小条实蝇属 *Ceratitis* 和果实蝇属 *Bactrocera*。在 *Bactrocera* 属 14 种实蝇中，除油橄榄果实蝇是 *Daculus* 亚属，瓜实蝇和南瓜实蝇是 *Zeugodacus* 亚属以外，其余 11 种均为 *Bactrocera* 亚属。

桔小实蝇与同一亚属(果实蝇亚属 *Bactrocera*)的其他近缘种之间的同源性很高，其中又以与杨桃实蝇、芒果实蝇、木瓜实蝇、菲律宾实蝇的同源性最高，均在 93.7%以上(表 3)。在形态学分类上，这 5 个种属于桔小实蝇复合种团(*B*. *dorsalis* complex)(Drew and Hancock, 1994)。桔小实蝇与另外 4 个不同亚属的物种之间的同源性都低于 85%，其中与南瓜实蝇的同源性最低，只有 82.9%。

表 3　桔小实蝇及 GenBank 收录近缘种 COⅠ基因的相似度(对角线上)和分歧度(对角线下)

Table 3　Similarity (above diagonal) and divergence (below diagonal) of COⅠ genes of *Bactrocera dorsalis* and the related species deposited in GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1		90.6	95.1	90.9	96.6	91.9	97.3	98.5	98.4	92.0	86.9	83.2	85.5	85.3	82.6
2	9.2		90.0	90.3	89.8	88.7	90.1	90.8	91.1	88.6	84.4	86.4	85.6	85.3	83.9
3	2.6	9.8		87.5	92.6	88.5	93.7	95.0	95.0	88.5	83.8	84.9	84.5	82.9	84.4
4	9.2	9.6	10.6		90.3	90.4	90.6	91.3	91.4	90.9	86.1	84.1	85.7	86.0	82.7
5	3.5	10.1	5.4	10.2		90.1	96.9	95.9	96.5	90.3	86.3	83.8	84.9	85.0	82.0
6	8.7	11.4	9.9	9.9	10.4		91.0	92.0	91.9	98.7	86.6	82.9	85.1	85.3	80.1
7	2.7	9.9	4.2	9.9	3.2	9.7		96.8	96.8	91.4	86.9	83.6	84.8	84.8	82.2
8	1.5	9.2	2.8	9.0	4.1	8.5	3.3		97.9	92.2	87.5	83.9	85.7	85.4	82.7
9	1.6	8.8	2.8	8.7	3.7	8.7	3.2	2.0		91.9	86.9	83.3	85.2	85.7	82.6
10	8.5	11.6	9.9	9.4	10.3	1.3	9.2	8.3	8.5		86.9	82.0	85.5	85.1	80.7
11	13.8	16.4	15.1	14.5	14.4	14.3	13.8	13.1	13.6	13.9		80.8	82.1	81.0	78.2
12	16.4	14.3	16.5	15.0	15.6	16.5	15.8	15.6	16.2	17.7	18.8		83.9	82.2	83.6
13	15.2	15.9	16.4	15.0	15.8	15.4	16.2	15.0	15.4	14.8	18.9	17.3		95.9	86.0
14	14.6	16.3	15.9	14.0	15.3	14.7	15.3	14.7	14.2	14.9	19.9	17.3	4.2		83.5
15	16.2	16.6	16.1	15.6	16.9	19.3	16.9	16.2	16.2	18.5	21.8	17.3	14.1	14.8	

1：杨桃实蝇 *Bactrocera carambolae*；2：番石榴实蝇 *B*. *correcta*；3：桔小实蝇 *B*. *dorsalis*；4：短条面包果实蝇 *B*. *frauenfeldi*；5：香蕉实蝇 *B*. *musa*；6：小昆士兰实蝇 *B*. *neohumeralis*；7：芒果实蝇 *B*. *occipitalis*；8：木瓜实蝇 *B*. *papayae*；9：菲律宾实蝇 *B*. *philippinensis*；10：昆士兰实蝇 *B*. *tryoni*；11：三带实蝇 *B*. *umbrosa*；12：油橄榄果实蝇 *B*. *oleae*；13：瓜实蝇 *B*. *cucurbitae*；14：南瓜实蝇 *B*. *tau*；15：地中海实蝇 *Ceratitis capitata*.

3　讨论

在桔小实蝇线粒体 DNA 中，AT 含量近似的基因都是位于 J 链上，AT 含量差异很大的基因都位于 N 链上，而且在油橄榄果实蝇和地中海实蝇中也有类似的现象。其可能的原因是受进化压力的影响，自然选择对蛋白编码基因施加不同的替代压力，使得不同区域产生碱基选择的偏好性。这一现象也许会对分子系统发生的研究产生积极的作用，将相关物种的线粒体单一基因进行分析，由其碱基组成来判断相互之间亲缘关系的远近(Nardi *et al*., 2003)。

目前，实蝇的分类以成虫形态学特征为主要鉴定依据，15 种实蝇 COⅠ基因序列比对分析结果表明，果实蝇属 *Bactrocera* 亚属内 COⅠ基因同源性大都高于不同亚属间，这一结果与形态学分类的结果基本一致(表 3)。但由于实蝇种类多，形态分类还没有统一标准，各家意见不一，有些种类的分类地位较为混乱，如寡鬃实蝇族(Dacini)内属或亚属之间的关系。同时，实蝇新属和新种描述还在增加(Drew, 1989；Hancock and Drew, 2003)，特别是一些复合种团的分类还存在争议，如桔小实蝇复合种团中的木瓜

实蝇和杨桃实蝇可以交配，产生后代；有的种类需借助分布和寄主才能区分。桔小实蝇复合种团的区分需借助更能反映实蝇生命本质的分子生物学方法（Yu *et al*.，2005）。桔小实蝇线粒体基因组全序列的测定，为实蝇分子进化和分子鉴定研究提供了更多的标记基因。

实蝇 mtDNA 基因序列数量仍有限，限制了实蝇分子进化研究。而且部分已知序列可能需要进一步修订，如油橄榄果实蝇和地中海实蝇 mtDNA 全序列均已两次修订，因此，应用某些 mtDNA 序列特异性位点进行分子种类区分时，还需反复实验验证该位点的稳定性，以排除个体基因突变或者测序误差的影响。同时应用单一基因进行系统进化研究仍有局限性，如单一 COⅠ基因不适用于桔小实蝇、杨桃实蝇、木瓜实蝇、菲律宾实蝇、芒果实蝇等复合种团以及桔小实蝇不同地理种群的系统分析（余道坚，2005）。要解决实蝇科昆虫中类似桔小实蝇复合种团等低级阶元的系统进化问题，需要寻找进化速率更快的基因（如 NADH 亚基基因）或片段（微卫星 DNA）等，甚至同时应用多个进化速度不等的基因进行遗传分析。

致谢 中国科学院动物研究所汪兴鉴研究员对本文初稿提出了宝贵的修改意见，在此表示特别感谢。

参 考 文 献（References）

Aloni Y, Attardi G, 1971. Expression of the mitochondrial genome in Hela cells: Ⅱ. Evidence for complete transcription of mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, 55: 251–270.

Bae JS, Kim I, Sohn HD, Jin BR, 2004. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and phylogenetic analysis with other insects. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 978–985.

Beard CB, Mill D, Collins FH, 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol. Biol.*, 2: 103–124.

Christenson LD, Foote RH, 1960. Biology of fruit flies. *Ann. Rev. Entomol.*, 5(2): 171–192.

Crozier RH, Crozier YC, 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 133: 97–117.

Drew RAI, 1989. The tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the Australasian and Oceanian Regions. *Mem. Qd. Mus.*, 26: 1–521.

Drew RAI, Hancock DL, 1994. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. *Bull. Entomol. Res.*, 2 (Suppl.): 1–68.

Hancock DL, Drew RAI, 2003. A new genus and new species, combinations and records of Tephritinae (Diptera: Tephritidae) from Australia, New Zealand and the South Pacific. *Aust. Entomol.*, 30: 141–158.

Hou BH, Zhang RJ, 2005. Potential distributions of the fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in China as predicted by CLIMEX. *Acta Ecologica Sinica*, 25(7): 1 569–1 574. [侯柏华，张润杰，2005. 基于 CLIMEX 的桔小实蝇在中国适生区的预测. 生态学报，5(7): 1 569–1 574]

Liang GH, Chen JH, Yang JQ, Huang JC, Ji QE, 2003. Advances in research of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in China. *Entomological Journal of East China*, 12(2): 90–98. [梁光红，陈家骅，杨建全，黄居昌，季清娥，2003. 桔小实蝇国内研究概况. 华东昆虫学报，12(2): 90–98]

Lin TJ, Zeng L, Liang GW, Lu YY, Bin SY, 2005. Effects of entomopathogenic nematodes on the oriental fruit fly, *Bactrocera* (*Bactrocera*) *dorsalis* (Hendel). *Acta Entomologica Sinica*, 48(5): 736–741. [林进添，曾玲，梁广文，陆永跃，宾淑英，2005. 病原线虫对桔小实蝇种群的控制作用. 昆虫学报，48(5): 736–741]

Nardi F, Carapelli A, Dallai R, 2003. The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Mol. Biol.*, 12(6): 605–611.

Pan ZP, Zeng L, Wen SY, 2006. Microsatellite DNA polymorphism in different pesticide-resistant strains of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tetriphitidae). *Acta Entomologica Sinica*, 49(5): 874–877. [潘志萍，曾玲，温硕洋，2006. 桔小实蝇抗性品系的微卫星 DNA 分析. 昆虫学报，49(5): 874–877]

Shi W, Ye H, 2004. Genetic differentiation in five geographic populations of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) in Yunnan province. *Acta Entomologica Sinica*, 47(3): 384–388. [施伟，叶辉，2004. 云南桔小实蝇五个地理种群的遗传分化研究. 昆虫学报，47(3): 384–388]

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Rook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87: 1–51.

Spanos L, Koutroumbas G, Kotsyfakis M, 2000. The mitochondrial genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.*, 9: 139–144.

Vigilan L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC, 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 253(5 027): 1 503–1 507.

Wang XJ, 1996. The fruit flies (Diptera: Tephritidae) of the East Asian region. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 21(Suppl.): 1–338. [汪兴鉴，1996. 东亚地区双翅目实蝇科昆虫. 动物分类学报，21(增刊): 1–338]

Wolstenholme DR, Clary DO, 1985. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics*, 109: 725–744.

Wolstenholme DR, 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.*, 141: 173–216.

Yu DJ, Chen ZL, Zhang RJ, Yin WY, 2005. Real-time qualitative PCR for

the inspection and identification of *Bactrocera philippinensis* and *Bactrocera occipitalis*（Diptera：Tephritidae）using SYBR Green assay. *Raffles Bull*. *Zool*.，53：103 – 108.

Yu DJ，2005. Study on Rapid Identification of Quarantine Fruit Fly（Diptera：Tephritidae）Based on Molecular Techniques. PhD Thesis，Graduate School of the Chinese Academy of Sciences，Beijing. 11 – 16，32 – 54. [余道坚，2005. 检疫性实蝇分子生物学快速鉴定技术的研究. 中国科学院研究生院博士学位论文. 11 – 16，32 – 54]

Zhang D，Hewitt GM，1997. Insect mitochondrial control region：A review of its structure，evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochem*. *Syst*. *Ecol*.，25（2）：99 – 120.

Zhang QY，Lin ZJ，Liu JY，Chen HZ，Gao QZ，Sun GK，Hong ZQ，Sun DF，Chen JF，1998. Study on the biology of oriental fruit fly. *Entomological Journal of East China*，7（2）：65 – 68. [张清源，林振基，刘金耀，陈华忠，高泉准，孙国坤，洪赞侨，孙德华，陈加福，1998. 桔小实蝇生物学特性. 华东昆虫学报，7（2）：65 – 68]

Zhang YP，Shi LM，1992. Mitochondrial DNA polymorphisms in animals：a review. *Zoological Research*，13（3）：289 – 298. [张亚平，施立明，1992. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况. 动物学研究，13（3）：289 – 298]

Zhu ZH，Ye H，Zhang ZY，2005. Molecular identification of six *Bactrocera* species（Diptera：Tephritidae）based on mtDNA. *Acta Entomologica Sinica*，48（3）：386 – 390. [朱振华，叶辉，张志英，2005. 基于 mtDNA Cytb 的六种果实蝇的分子鉴定（双翅目：实蝇科）. 昆虫学报，48（3）：386 – 390]

（责任编辑：袁德成）